

Novel liver regeneration related protein, its code sequence and application

Patent number: CN1367179
Publication date: 2002-09-04
Inventor: ZHAO MUJUN (CN); LIU ZHANWU (CN); LI ZAIPING (CN)
Applicant: SHANGHAI INST OF BIO CHEMISTRY (CN)
Classification:
- **international:** C07K14/47; C12N15/63; C12P21/02; A61K38/17; C07K16/18; C07H21/00; C12N15/10; C12N15/11; C12N15/12
- **european:**
Application number: CN20010105282 20010122
Priority number(s): CN20010105282 20010122

Report a data error here

Abstract of CN1367179

The present invention provides a novel liver regeneration associated protein-LRTM4 protein and polynucleotide for coding LPTM4 protein. This invention also discloses the preparation method and application of LRTM4 protein and its polynucleotide. This invention also discloses the method for curing several diseases by using the said LRTM4 protein, for example, for repairing liver injury. This invention also provides a medicine composition containing LRTM4 protein.

Data supplied from the *esp@cenet* database - Worldwide

Best Available Copy

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01105282.1

C07K 14/47
C07K 16/18 C07H 21/00
C12N 15/10 C12N 15/11
C12N 15/12 C12N 15/63
C12P 21/02 A61K 38/17
A61K 31/7088 G01N 33/68
A61P 35/00
[11]公开号 CN 1367179A

[43]公开日 2002 年 9 月 4 日

[22]申请日 2001.1.22 [21]申请号 01105282.1
[71]申请人 中国科学院上海生物化学研究所
地址 200031 上海市岳阳路 320 号
[72]发明人 赵慕钧 刘占武 李载平

[74]专利代理机构 上海专利商标事务所
代理人 徐 迅

权利要求书 1 页 说明书 21 页 附图页数 2 页

[54]发明名称 新的肝再生相关蛋白、其编码序列及用途

[57]摘要

本发明提供了一种新的肝再生相关蛋白 - LRTM4 蛋白以及编码 LRTM4 蛋白的多核苷酸。本发明还公开了 LRTM4 蛋白及其多核苷酸的制法和用途。本发明还公开了此 LRTM4 蛋白用于治疗多种疾病的方法,如用于肝脏损伤的修复等疾病。本发明还提供了含 LRTM4 蛋白的药物组合物。

ISSN 1008-4274

权利要求书

1. 一种分离的LRTM4多肽，其特征在于，它包含：具有SEQ ID NO：2氨基酸序列的多肽、或其保守性变异多肽、或其活性片段、或其活性衍生物。

5 2. 如权利要求1所述的多肽，其特征在于，该多肽是具有SEQ ID NO：2氨基酸序列的多肽。

3. 一种分离的多核苷酸，其特征在于，它包含一核苷酸序列，该核苷酸序列与选自下组的一种核苷酸序列有至少75%相同性：

(a) 编码如权利要求1和2所述多肽的多核苷酸；

10 (b) 与多核苷酸(a)互补的多核苷酸。

4. 如权利要求3所述的多核苷酸，其特征在于，该多核苷酸编码具有SEQ ID NO：2所示氨基酸序列的多肽。

5. 如权利要求3所述的多核苷酸，其特征在于，该多核苷酸的序列选自下组的一种：

15 (a) 具有SEQ ID NO：1中335-940位的序列；

(b) 具有SEQ ID NO：1中1-1576位的序列。

6. 一种载体，其特征在于，它含有权利要求3所述的多核苷酸。

7. 一种遗传工程化的宿主细胞，其特征在于，它含有权利要求6所述的载体。

8. 一种具有LRTM4蛋白活性的多肽的制备方法，其特征在于，该方法包含：

20 (a) 在适合表达LRTM4蛋白的条件下，培养权利要求7所述的宿主细胞；

(b) 从培养物中分离出具有LRTM4蛋白活性的多肽。

9. 一种能与权利要求1所述的LRTM4蛋白特异性结合的抗体。

10. 一种药物组合物，其特征在于，它含有安全有效量的权利要求 1 所述的多肽或权利要求 3 所述的多核苷酸或权利要求 6 所述的载体，以及药学上可接受的赋形剂、稀释剂或载体。

11. 一种检测样品中是否存在LRTM4蛋白的方法，其特征在于，包括：

将样品与权利要求9所述的抗体接触，

观察是否形成抗体复合物，形成了抗体复合物就表示样品中存在LRTM4蛋白。

新的肝再生相关蛋白、其编码序列及用途

- 5 本发明属于分子生物学和医学领域，具体地说，本发明涉及新的编码肝再生相关蛋白-LRTM4 的多核苷酸，以及此多核苷酸编码的多肽。本发明还涉及此多核苷酸和多肽的用途和制备。具体地说，本发明的多肽是一种新的与肝再生有关的肝再生相关蛋白。
- 10 肝脏具有明显的再生现象，肝脏部分切除后，或受到物理及化学损伤时，肝脏就开始再生，并且再生持续到肝脏与身体的比例到达一定值时终止。肝再生现象与多种肝脏疾病相伴随，如肝硬化、急慢性肝炎等。肝癌的发生过程也往往伴随有肝再生现象；同时，临床上肝再生现象被应用于部分肝脏移植以及肝细胞移植。
- 15 肝癌是一种世界范围内的恶性肿瘤，死亡率极高，尤其中国是肝癌的高发地区。每年世界范围内有 25 万人死于肝癌，我国占了其中的 40%(李绍白，《肝脏病学》，人民卫生出版社，1995)。肝癌的发生与病毒感染如乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)、丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)感染有关，食用含有黄曲霉毒素等致癌物质的水和食物等都是肝癌发病的主要因素。目前还
- 20 发现肝癌发生与肝脏再生有密切的关系：肝癌发生的过程往往伴有肝再生现象。现已知道，肝再生是受到紧密调控的肝细胞增殖，而肝细胞癌是肝细胞不受控制的增殖。现在有的学说认为，肝癌发生的过程包括肝脏被病毒或化学物质损伤，持续的损伤导致持续的再生，再生失去控制后便成为肝癌。所以了解肝癌与肝再生的关系，无疑有助于人们更好地对早期肝癌进行预测与治疗。
- 25 目前，对于一些肝脏疾病的治疗最有效的方案是肝脏移植，而且肝脏移植手术的技术已经比较成熟，但是每年能够受益于这一技术的人数非常有限，这是因为目前的肝脏移植有两个方面受到限制：供体来源和免疫排斥。要想使更多的人受益于肝脏移植，就必须突破这两个限制。现在突破这个限制的主要策略是部分肝移植和肝细胞移植。部分肝移植可以使一个供体肝脏移植到两个人或者更多，
- 30 同时也使亲属间肝脏移植成为可能，从而减少了免疫排斥。另外一个更理想的方案是肝细胞移植，即将肝细胞直接移植进病人肝脏或者脾脏部位，肝细胞逐渐再生，承担起肝脏的功能。肝细胞移植可以利用病人自己的肝细胞，从而不会发生

免疫排斥现象；同时对病人肝细胞进行体外培养并导入特定的基因，能够进行基因治疗。

为了满足部分肝移植及肝细胞移植等的需求，本领域迫切需要了解与肝组织再生有关的因素，尤其是与肝再生有关的基因和蛋白。

5

本发明的目的是提供一种新的肝再生相关蛋白-LRTM4 蛋白以及其片段、类似物和衍生物。

本发明的另一目的是提供编码这些多肽的多核苷酸。

10 本发明的另一目的是提供生产这些多肽的方法以及该多肽和编码序列的用途。本发明的 LRTM4 基因，是一个在国内外未见报道的新基因，对它的分子机制的研究有利于阐明肝脏再生的分子生物学机制，同时也可能用于肝脏疾病的基因治疗。

15 在本发明的第一方面，提供新颖的分离出的 LRTM4 多肽，该多肽源自大鼠，它包含：具有 SEQ ID NO: 2 氨基酸序列的多肽、或其保守性变异多肽、或其活性片段、或其活性衍生物。较佳地，该多肽是具有 SEQ ID NO: 2 氨基酸序列的多肽。

20 在本发明的第二方面，提供编码分离的这些多肽的多核苷酸，该多核苷酸包含一核苷酸序列，该核苷酸序列与选自下组的一种核苷酸序列有至少 75% 相同性：(a) 编码上述 LRTM4 多肽的多核苷酸；和 (b) 与多核苷酸 (a) 互补的多核苷酸。较佳地，该多核苷酸编码具有 SEQ ID NO: 2 所示氨基酸序列的多肽。更佳地，该多核苷酸的序列是选自下组的一种：(a) 具有 SEQ ID NO: 1 中 335-940 位的序列；(b) 具有 SEQ ID NO: 1 中 1-1576 位的序列。

25 在本发明的第三方面，提供了含有上述多核苷酸的载体，以及被该载体转化或转导的宿主细胞或者被上述多核苷酸直接转化或转导的宿主细胞。

在本发明的第四方面，提供了制备具有 LRTM4 蛋白活性的多肽的方法，该方法包含：(a) 在适合表达 LRTM4 蛋白的条件下，培养上述被转化或转导的宿主细胞；(b) 从培养物中分离出具有 LRTM4 蛋白活性的多肽。

30 在本发明的第五方面，提供了与上述的 LRTM4 多肽特异性结合的抗体。还提供了可用于检测的核酸分子，它含有上述的多核苷酸中连续的 15-1576 个核苷酸。

在本发明的第六方面，提供了模拟、促进、拮抗 LRTM4 多肽活性的化合物，

以及抑制 LRTM4 多肽的表达的化合物。还提供了筛选和/或制备这些化合物的方法。较佳地, 该化合物是 LRTM4 多肽的编码序列(或其片段)的反义序列。

在本发明的第七方面, 提供了检测样品中是否存在 LRTM4 蛋白的方法, 它包括: 将样品与 LRTM4 蛋白的特异性抗体接触, 观察是否形成抗体复合物, 形成了
5 抗体复合物就表示样品中存在 LRTM4 蛋白。

在本发明的第八方面, 提供了一种检测与 LRTM4 多肽异常表达相关的疾病或疾病易感性的方法, 该方法包括: 检测编码所述多肽的核酸序列中是否存在突变。

在本发明的第九方面, 提供了本发明多肽和编码序列的用途。

在本发明的第十方面, 提供了一种药物组合物, 它含有安全有效量的本发明的
10 的 LRTM4 多肽、或其编码序列、或含该编码序列的载体, 以及药学上可接受的赋形剂、稀释剂和载体。这些药物组合物可应用于肝炎或重症肝炎引起的肝细胞损伤后修复, 以及应用于肝癌的治疗, 肝脏部分移植以及肝细胞移植中促进肝细胞增殖等病症。

本发明的其它方面由于本文的技术的公开, 对本领域的技术人员而言是显而
15 易见的。

本发明人通过抑制差减杂交法克隆了一个肝再生过程中高表达的新基因 LRTM4。全序列测定该 cDNA 全长为 1576bp(见 SEQ ID NO.1), 编码了一个由 202
20 个氨基酸组成的 LRTM4 蛋白质(见 SEQ ID NO.2)。同源性分析表明 LRTM4 为一个新基因。

LRTM4 蛋白是一个四跨膜蛋白, 与肝再生密切相关, 可应用于促进肝脏再生和肝脏损伤修复。

用点杂交方法对 LRTM4 表达进行分析, 发现该基因在肝脏再生过程中在正常肝中有一定的表达, 在肝再生过程中表达明显升高, 且表达量与肝再生持续的时间有关, 这表明基因 LRTM4 与肝再生有很高的相关性。
25

对 LRTM4 基因进行 Northern 印迹组织分布分析表明, 该基因在有细胞增殖的组织中表达, 可以作为细胞增殖的标志。

大鼠四氯化碳肝损伤动物模型中进行的进一步实验表明, LRTM4 基因具有促进肝脏损伤修复即促进再生的作用, 可应用于肝部分移植及肝细胞移植中促进再
30 生、急慢性肝炎造成的肝细胞损伤的修复, 具有重要的应用价值。

下列附图用于说明本发明的具体实施方案, 而不用于限定由权利要求书所

界定的本发明范围。

图 1 显示了 RNA 点杂交检测的 LRTM4 基因在肝再生过程中的表达情况。图中：1、2、3 分别表示总 RNA 的取样量为 5、15、45 μ g 点在尼龙膜上，0 h、24 h、48h、72 h 为大鼠肝部分切除后的时间；LRTM4 表示用基因片段做探针杂交后的结果，18S 表示用 18S 核糖体 RNA 基因片段做探针杂交的结果，作为参照。

图 2 显示了以 LRTM4 cDNA 为探针，与大鼠不同组织 mRNA 的 Northern 杂交结果。图中：9 个组织包括再生肝、正常肝、睾丸、脾脏、前列腺、骨骼肌、肺、心脏、脑。上图为用 LRTM4 基因片段标记作为探针杂交的结果，18S 与 28S 指示电泳条带所在位置，杂交条带的大小为 1.6 Kb；下图为用 18 S 核糖体 RNA 片段标记作为探针杂交的结果，作为参照。

图 3 显示了在四氯化碳肝损伤大鼠模型中，肝脏 LRTM4 的表达与血浆谷丙转氨酶(GPT)的相关性。图中：不同处理组 1 为正常大鼠，2、3 为灌喂 0.5 毫升四氯化碳/千克体重，4、5 灌喂 1 毫升四氯化碳/千克体重，其中 3、5 均导入 LRTM4 基因。GPT 水平为谷丙转氨酶单位/毫升，LRTM4 基因表达量为经过管家基因 GAPDH 标准化后的相对比值。基因强度的测定方法是 LRTM4 与 GAPDH 的扩增产物同时电泳，扫描定量，计算 LRTM4 与 GAPDH 量的比值作为 LRTM4 的表达水平。图中曲线表示在不同的处理中测得的 LRTM4 的表达水平，柱状图表示血液中谷丙转氨酶 GPT 水平。图中可以看出，GPT 水平与 LRTM4 表达水平呈负相关。

图 4 是 LRTM4 的 CDNA 序列和氨基酸序列。

在本发明中，术语“LRTM4 蛋白”、“LRTM4 多肽”或“肝再生相关蛋白 LRTM4”可互换使用，都指具有肝再生相关蛋白 LRTM4 氨基酸序列(SEQ ID NO:2)的蛋白或多肽。它们包括含有或不含起始甲硫氨酸的肝再生相关蛋白 LRTM4。

如本文所用，“分离的”是指物质从其原始环境中分离出来(如果是天然物质，原始环境即是天然环境)。如活体细胞内的天然状态下的多聚核苷酸和多肽是没有分离纯化的，但同样的多聚核苷酸或多肽如从天然状态中同存在的其他物质中分开，则为分离纯化的。

如本文所用，“分离的 LRTM4 蛋白或多肽”是指 LRTM4 多肽基本上不含天然与其相关的其它蛋白、脂类、糖类或其它物质。本领域的技术人员能用标准的蛋白质纯化技术纯化 LRTM4 蛋白。

本发明的多肽可以是重组多肽、天然多肽、合成多肽，优选重组多肽。本发明的多肽可以是天然纯化的产物，或是化学合成的产物，或使用重组技术从

原核或真核宿主(例如, 细菌、酵母、高等植物、昆虫和哺乳动物细胞)中产生。根据重组生产方案所用的宿主, 本发明的多肽可以是糖基化的, 或可以是非糖基化的。

5 本发明还包括 LRTM4 蛋白的片段、衍生物和类似物。如本文所用, 术语“片段”、“衍生物”和“类似物”是指基本上保持本发明的天然 LRTM4 蛋白相同的生物学功能或活性的多肽。本发明的多肽片段、衍生物或类似物可以是(i)有一个或多个保守或非保守性氨基酸残基(优选保守性氨基酸残基)被取代的多肽, 而这样的取代的氨基酸残基可以是也可以不是由遗传密码编码的, 或(ii)在一个或多个氨基酸残基中具有取代基团的多肽, 或(iii)成熟多肽与另一个化合物(比如
10 延长多肽半衰期的化合物, 例如聚乙二醇)融合所形成的多肽, 或(iv)附加的氨基酸序列融合到此多肽序列而形成的多肽(如前导序列或分泌序列或用来纯化此多肽的序列或蛋白原序列, 或与抗原 IgG 片段的形成的融合蛋白)。根据本文的教导, 这些片段、衍生物和类似物属于本领域熟练技术人员公知的范围。

一类特殊的 LRTM4 类似物是在其他哺乳动物(如牛、羊、兔、狗、猴、人等)
15 中 LRTM4 的同源蛋白。这些其他物种的同源蛋白的编码序列, 可根据本发明公开的序列, 通过杂交或扩增的方法而获得, 进而通过常规重组方法获得这些同源蛋白。

在本发明中, 术语“LRTM4 多肽”指具有 LRTM4 蛋白活性的 SEQ ID NO. 2 序列的多肽。该术语还包括具有与 LRTM4 蛋白相同功能的、SEQ ID NO. 2 序列的变异形式。这些变异形式包括(但并不限于): 若干个(通常为 1-50 个, 较佳地
20 1-30 个, 更佳地 1-20 个, 最佳地 1-10 个)氨基酸的缺失、插入和/或取代, 以及在 C 末端和/或 N 末端添加一个或数个(通常为 20 个以内, 较佳地为 10 个以内, 更佳地为 5 个以内)氨基酸。例如, 在本领域中, 用性能相近或相似的氨基酸进行取代时, 通常不会改变蛋白质的功能。又比如, 在 C 末端和/或 N 末端添加一个
25 一个或数个氨基酸通常也不会改变蛋白质的功能。该术语还包括 LRTM4 蛋白的活性片段和活性衍生物。

该多肽的变异形式包括: 同源序列、保守性变异体、等位变异体、天然突变体、诱导突变体、在高或低的严紧度条件下能与 LRTM4 DNA 杂交的 DNA 所编码的蛋白、以及利用抗 LRTM4 多肽的抗血清获得的多肽或蛋白。本发明还提供了其
30 他多肽, 如包含 LRTM4 多肽或其片段的融合蛋白(如 SEQ ID NO: 3 所示的融合蛋白)。除了几乎全长的多肽外, 本发明还包括了 LRTM4 多肽的可溶性片段。通常, 该片段具有 LRTM4 多肽序列的至少约 10 个连续氨基酸, 通常至少约 30 个连续氨

5 基酸，较佳地至少约 50 个连续氨基酸，更佳地至少约 80 个连续氨基酸，最佳地至少约 100 个连续氨基酸。

发明还提供 LRTM4 蛋白或多肽的类似物。这些类似物与天然 LRTM4 多肽的差别可以是氨基酸序列上的差异，也可以是不影响序列的修饰形式上的差异，或者兼而有之。这些多肽包括天然或诱导的遗传变异体。诱导变异体可以通过各种技术得到，如通过辐射或暴露于诱变剂而产生随机诱变，还可通过定点诱变法或其他已知分子生物学的技术。类似物还包括具有不同于天然 L-氨基酸的残基(如 D-氨基酸)的类似物，以及具有非天然存在的或合成的氨基酸(如 β 、 γ -氨基酸)的类似物。应理解，本发明的多肽并不限于上述列举的代表性的多肽。

10 修饰(通常不改变一级结构)形式包括：体内或体外的多肽的化学衍生形式如乙酰化或羧基化。修饰还包括糖基化，如那些在多肽的合成和加工中或进一步加工步骤中进行糖基化修饰而产生的多肽。这种修饰可以通过将多肽暴露于进行糖基化的酶(如哺乳动物的糖基化酶或去糖基化酶)而完成。修饰形式还包括具有磷酸化氨基酸残基(如磷酸酪氨酸，磷酸丝氨酸，磷酸苏氨酸)的序列。还包括被修
15 饰从而提高了其抗蛋白水解性能或优化了溶解性能的多肽。

在本发明中，“LRTM4蛋白保守性变异多肽”指与SEQ ID NO: 2的氨基酸序列相比，有至多10个，较佳地至多8个，更佳地至多5个，最佳地至多3个氨基酸被性质相似或相近的氨基酸所替换而形成多肽。这些保守性变异多肽最好根据表1进行氨基酸替换而产生。

表 1

最初的残基	代表性的取代	优选的取代
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Pro; Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe	Leu
Leu (L)	Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu

Phe (F)	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Leu
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala	Leu

本发明的多核苷酸可以是 DNA 形式或 RNA 形式。DNA 形式包括 cDNA、基因组 DNA 或人工合成的 DNA。DNA 可以是单链的或是双链的。DNA 可以是编码链或非编码链。编码成熟多肽的编码区序列可以与 SEQ ID NO:1 所示的编码区序列相同或者是简并的变异体。如本文所用, “简并的变异体” 在本发明中是指编码具有 SEQ ID NO:2 的蛋白质, 但与 SEQ ID NO:1 所示的编码区序列有差别的核酸序列。

编码 SEQ ID NO:2 的成熟多肽的多核苷酸包括: 只编码成熟多肽的编码序列; 成熟多肽的编码序列+各种附加编码序列; 成熟多肽的编码序列(和任选的附加编码序列)+非编码序列。

术语“编码多肽的多核苷酸”可以是包括编码此多肽的多核苷酸, 也可以是还包括附加编码和/或非编码序列的多核苷酸。

本发明还涉及上述多核苷酸的变异体, 其编码与本发明有相同的氨基酸序列的多肽或多肽的片段、类似物和衍生物。此多核苷酸的变异体可以是天然发生的等位变异体或非天然发生的变异体。这些核苷酸变异体包括取代变异体、缺失变异体和插入变异体。如本领域所知的, 等位变异体是一个多核苷酸的替换形式, 它可能是一个或多个核苷酸的取代、缺失或插入, 但不会从实质上改变其编码的多肽的功能。

本发明还涉及与上述的序列杂交且两个序列之间具有至少 60%, 较佳地至少 75%, 更佳地至少 80% 相同性的多核苷酸。本发明特别涉及在严格条件下与本发明所述多核苷酸可杂交的多核苷酸。在本发明中, “严格条件” 是指: (1) 在较低离子强度和较高温度下的杂交和洗脱, 如 $0.2 \times \text{SSC}$, $0.1\% \text{SDS}$, 60°C ; 或 (2) 杂交时加有变性剂, 如 $50\%(\text{v/v})$ 甲酰胺, 0.1% 小牛血清/ $0.1\% \text{Ficoll}$, 42°C 等; 或 (3) 仅在两条序列之间的相同性至少在 90% 以上, 更好是 95% 以上时才发生杂交。并且, 可杂交的多核苷酸编码的多肽与 SEQ ID NO:2 所示的成熟多肽有相同的生物学功能和活性。

本发明还涉及与上述的序列杂交的核酸片段。如本文所用, “核酸片段” 的长度至少含 15 个核苷酸, 较好是至少 30 个核苷酸, 更好是至少 50 个核苷酸,

最好是至少 100 个核苷酸以上。核酸片段可用于核酸的扩增技术(如 PCR)以确定和/或分离编码 LRTM4 蛋白的多聚核苷酸。

本发明的LRTM4核苷酸全长序列或其片段通常可以用PCR扩增法、重组法或人工合成的方法获得。对于PCR扩增法,可根据本发明所公开的有关核苷酸序列,尤其是开放阅读框序列来设计引物,并用市售的cDNA库或按本领域技术人员已知的常规方法所制备的cDNA库作为模板,扩增而得有关序列。当序列较长时,常常需要进行两次或多次PCR扩增,然后再将各次扩增出的片段按正确次序拼接在一起。

一旦获得了有关的序列,就可以用重组法来大批量地获得有关序列。这通常是将其克隆入载体,再转入细胞,然后通过常规方法从增殖后的宿主细胞中分离得到有关序列。

此外,还可用人工合成的方法来合成有关序列,尤其是片段长度较短时。通常,通过先合成多个小片段,然后再进行连接可获得序列很长的片段。

目前,已经可以完全通过化学合成来得到编码本发明蛋白(或其片段,或其衍生物)的 DNA 序列。然后可将该 DNA 序列引入本领域中已知的各种现有的 DNA 分子(或如载体)和细胞中。此外,还可通过化学合成将突变引入本发明蛋白序列中。

应用 PCR 技术扩增 DNA/RNA 的方法(Saiki, et al. Science 1985;230:1350-1354)被优选用于获得本发明的基因。用于 PCR 的引物可根据本文所公开的本发明的序列信息适当地选择,并可用常规方法合成。可用常规方法如通过凝胶电泳分离和纯化扩增的 DNA/RNA 片段。

本发明也涉及包含本发明的多核苷酸的载体,以及用本发明的载体或 LRTM4 蛋白编码序列经基因工程产生的宿主细胞,以及经重组技术产生本发明所述多肽的方法。

通过常规的重组 DNA 技术(Science, 1984; 224: 1431),可利用本发明的多聚核苷酸序列可用来表达或生产重组的 LRTM4 多肽。一般来说有以下步骤:

(1). 用本发明的编码 LRTM4 多肽的多核苷酸(或变异体),或用含有该多核苷酸的重组表达载体转化或转导合适的宿主细胞;

(2). 在合适的培养基中培养的宿主细胞;

(3). 从培养基或细胞中分离、纯化蛋白质。

本发明中, LRTM4 多核苷酸序列可插入到重组表达载体中。术语“重组表达载体”指本领域熟知的细菌质粒、噬菌体、酵母质粒、植物细胞病毒、哺乳动物细胞病毒如腺病毒、逆转录病毒或其他载体。在本发明中适用的载体包括但不限于

于：在细菌中表达的基于 T7 的表达载体；在哺乳动物细胞中表达的 pMSXND 表达载体和在昆虫细胞中表达的来源于杆状病毒的载体。总之，只要能在宿主体内复制和稳定，任何质粒和载体都可以用。表达载体的一个重要特征是通常含有复制起点、启动子、标记基因和翻译控制元件。

5 本领域的技术人员熟知的方法能用于构建含 LRTM4 编码 DNA 序列和合适的转录/翻译控制信号的表达载体。这些方法包括体外重组 DNA 技术、DNA 合成技术、体内重组技术等 (Sambrook, et al. Molecular Cloning, a Laboratory Manual, cold Spring Harbor Laboratory. New York, 1989)。所述的 DNA 序列可有效连接到表达载体中的适当启动子上，以指导 mRNA 合成。这些启动子的代表性例子
10 有：大肠杆菌的 lac 或 trp 启动子； λ 噬菌体 P_L 启动子；真核启动子包括 CMV 立即早期启动子、HSV 胸苷激酶启动子、早期和晚期 SV40 启动子和其他一些已知的可控制基因在原核或真核细胞或其病毒中表达的启动子。表达载体还包括翻译起始用的核糖体结合位点和转录终止子。

此外，表达载体优选地包含一个或多个选择性标记基因，以提供用于选择转
15 化的宿主细胞的表型性状，如真核细胞培养用的二氢叶酸还原酶、新霉素抗性以及绿色荧光蛋白 (GFP)，或用于大肠杆菌的四环素或氨苄青霉素抗性。

包含上述的适当 DNA 序列以及适当启动子或者控制序列的载体，可以用于转化适当的宿主细胞，以使其能够表达蛋白质。

宿主细胞可以是原核细胞，如细菌细胞；或是低等真核细胞，如酵母细胞；
20 或是高等真核细胞，如哺乳动物细胞。代表性例子有：大肠杆菌，链霉菌属；鼠伤寒沙门氏菌的细菌细胞；真菌细胞如酵母；植物细胞；果蝇 S2 或 Sf9 的昆虫细胞；CHO、COS、293 细胞等动物细胞。

本发明的多核苷酸在高等真核细胞中表达时，如果在载体中插入增强子序列时将会使转录得到增强。增强子是 DNA 的顺式作用因子，通常大约有 10 到 300
25 个碱基对，作用于启动子以增强基因的转录。可举的例子包括在复制起始点晚期一侧的 100 到 270 个碱基对的 SV40 增强子、在复制起始点晚期一侧的多瘤增强子以及腺病毒增强子等。

本领域一般技术人员都清楚如何选择适当的载体、启动子、增强子和宿主细胞。

30 用重组 DNA 转化宿主细胞可用本领域技术人员熟知的常规技术进行。当宿主为原核生物如大肠杆菌时，能吸收 DNA 的感受态细胞可在指数生长期后收获，用 CaCl₂ 法处理，所用的步骤在本领域众所周知。另一种方法是使用 MgCl₂。如果需要，转化也可用电穿孔的方法进行。当宿主是真核生物，可选用如下的 DNA 转染

方法：磷酸钙共沉淀法，常规机械方法如显微注射、电穿孔、脂质体包装等。

获得的转化子可以用常规方法培养，表达本发明的基因所编码的多肽。根据所用的宿主细胞，培养中所用的培养基可选自各种常规培养基。在适于宿主细胞生长的条件下进行培养。当宿主细胞生长到适当的细胞密度后，用合适的方法（如温度转换或化学诱导）诱导选择的启动子，将细胞再培养一段时间。

在上面的方法中的重组多肽可在细胞内、或在细胞膜上表达、或分泌到细胞外。如果需要，可利用其物理的、化学的和其它特性通过各种分离方法分离和纯化重组的蛋白。这些方法是本领域技术人员所熟知的。这些方法的例子包括但不限于：常规的复性处理、用蛋白沉淀剂处理（盐析方法）、离心、渗透破菌、超处理、超离心、分子筛层析（凝胶过滤）、吸附层析、离子交换层析、高效液相层析（HPLC）和其它各种液相层析技术及这些方法的结合。

重组的 LRTM4 蛋白或多肽有多方面的用途。这些用途包括（但不限于）：直接做为药物治疗 LRTM4 蛋白功能低下或丧失所致的疾病（尤其是促进肝脏损伤的修复），和用于筛选促进或对抗 LRTM4 蛋白功能的抗体、多肽或其它配体。用表达的重组 LRTM4 蛋白筛选多肽库可用于寻找有治疗价值的能抑制或刺激 LRTM4 蛋白功能的多肽分子。

另一方面，本发明还包括对 LRTM4 DNA 或是其片段编码的多肽具有特异性的多克隆抗体和单克隆抗体，尤其是单克隆抗体。这里，“特异性”是指抗体能结合于 LRTM4 基因产物或片段。较佳地，指那些能与 LRTM4 基因产物或片段结合但不识别和结合于其它非相关抗原分子的抗体。本发明中抗体包括那些能够结合并抑制 LRTM4 蛋白的分子，也包括那些并不影响 LRTM4 蛋白功能的抗体。本发明还包括那些能与修饰或未经修饰形式的 LRTM4 基因产物结合的抗体。

本发明不仅包括完整的单克隆或多克隆抗体，而且还包括具有免疫活性的抗体片段，如 Fab' 或 (Fab)₂ 片段；抗体重链；抗体轻链；或嵌合抗体。

本发明的抗体可以通过本领域内技术人员已知的各种技术进行制备。例如，纯化的 LRTM4 基因产物或者其具有抗原性的片段，可被施用于动物（如家兔，小鼠等）以诱导多克隆抗体的产生。与之相似的，表达 LRTM4 蛋白或其具有抗原性的片段的细胞可用来免疫动物来生产抗体。可使用多种佐剂增强免疫反应，其中包括（但不限于）弗氏佐剂等。

本发明的单克隆抗体可以利用杂交瘤技术来制备。本发明的各类抗体可以利用 LRTM4 基因产物的片段或功能区，通过常规免疫技术获得。这些片段或功能区可以利用重组方法制备或利用多肽合成仪合成。与 LRTM4 基因产物的未修饰形式结合的抗体可以用原核细胞（例如 *E. Coli*）中生产的基因产物来免疫动物而产

生；与翻译后修饰形式结合的抗体(如糖基化或磷酸化的蛋白或多肽)，可以用真核细胞(例如酵母或昆虫细胞)中产生的基因产物来免疫动物而获得。

5 抗 LRTM4 蛋白的抗体可用于免疫组织化学技术中，检测活检标本中的 LRTM4 蛋白。此外，与 LRTM4 蛋白结合的单克隆抗体也可用放射性同位素标记，注入体内可跟踪其位置和分布。这种放射性标记的抗体可作为一种非创伤性诊断方法用于肿瘤细胞的定位和判断是否有转移。

利用本发明蛋白，通过各种常规筛选方法，可筛选出与 LRTM4 蛋白发生相互作用的物质，如受体、抑制剂、激动剂或拮抗剂等。

10 本发明蛋白及其抗体、抑制剂、激动剂、拮抗剂或受体等，当在治疗上进行施用(给药)时，可提供不同的效果。通常，可将这些物质配制于无毒的、惰性的和药学上可接受的水性载体介质中，其中 pH 通常约为 5-8，较佳地 pH 约为 6-8，尽管 pH 值可随被配制物质的性质以及待治疗的病症而有所变化。配制好的药物组合物可以通过常规途径进行给药，其中包括(但不限于)：肌内、腹膜内、静脉内、皮下、皮内、或局部给药。

15 本发明的多肽可直接用于疾病治疗，例如，用于肝脏损伤修复方面的治疗。在使用本发明 LRTM4 蛋白时，还可同时使用其他治疗剂。

20 本发明还提供了一种药物组合物，它含有安全有效量的本发明 LRTM4 多肽或其激动剂、拮抗剂以及药学上可接受的载体或赋形剂。这类载体包括(但不限于)：盐水、缓冲液、葡萄糖、水、甘油、乙醇、及其组合。药物制剂应与给药方式相匹配。本发明的药物组合物可以被制成针剂形式，例如用生理盐水或含有葡萄糖和其他辅剂的水溶液通过常规方法进行制备。诸如片剂和胶囊之类的药物组合物，可通过常规方法进行制备。药物组合物如针剂、溶液、片剂和胶囊宜在无菌条件下制造。活性成分的给药量是治疗有效量，例如每天约 1 微克/千克体重-约 5 毫克/千克体重。此外，本发明的多肽还可与其他治疗剂一起使用。

25 使用药物组合物时，是将安全有效量的 LRTM4 蛋白或其拮抗剂、激动剂施用于哺乳动物，其中该安全有效量通常至少约 10 微克/千克体重，而且在大多数情况下不超过约 8 毫克/千克体重，较佳地该剂量是约 10 微克/千克体重-约 1 毫克/千克体重。当然，具体剂量还应考虑给药途径、病人健康状况等因素，这些都是熟练医师技能范围内的。

30 LRTM4 蛋白的多聚核苷酸也可用于多种治疗目的。基因治疗技术可用于治疗由于 LRTM4 蛋白的无表达、无活性或活性低下所致的细胞增殖、发育或代谢异常，也可用于增加 LRTM4 的表达和活性(例如用于促进肝再生)。重组的基因治疗载体(如病毒载体)可设计成表达 LRTM4 蛋白，以增加内源性的 LRTM4 蛋白活性。来源

于病毒的表达载体如逆转录病毒、腺病毒、腺病毒相关病毒、单纯疱疹病毒、细小病毒等可用于将 LRTM4 基因转移至细胞内。构建携带外源基因的重组病毒载体的方法可见于已有文献(Sambrook, et al.)。另外重组 LRTM4 基因可包装到脂质体中, 然后再转移至细胞内。

5 抑制 LRTM4 mRNA 的寡聚核苷酸(包括反义 RNA 和 DNA)以及核酶也在本发明的范围之内。反义的 RNA 和 DNA 及核酶可用已有的任何 RNA 或 DNA 合成技术获得, 如固相磷酸酰胺化学合成法合成寡核苷酸的技术已广泛应用。反义 RNA 分子可通过编码该 RNA 的 DNA 序列在体外或体内转录获得。这种 DNA 序列已整合到载体的 RNA 聚合酶启动子的下游。为了增加核酸分子的稳定性, 可用多种方法对其进行
10 修饰, 如增加两侧的序列长度, 核糖核苷之间的连接应用磷酸硫酸酯键或肽键而非磷酸二酯键。

多聚核苷酸导入组织或细胞内的方法包括: 将多聚核苷酸直接注入到体内组织中; 或在体外通过载体(如病毒、噬菌体或质粒等)先将多聚核苷酸导入细胞中, 再将细胞移植到体内等。

15 能与 LRTM4 蛋白结合的多肽分子可通过筛选由各种可能组合的氨基酸结合于固相物组成的随机多肽库而获得。

本发明还涉及定量和定位检测 LRTM4 蛋白水平的诊断试验方法。这些试验是本领域所熟知的, 且包括 FISH 测定和放射免疫测定。试验中所检测的 LRTM4 蛋白水平, 可以用作解释 LRTM4 蛋白在各种疾病中的重要性和用于诊断 LRTM4 蛋白
20 起作用的疾病。

一种检测检测样品中是否存在 LRTM4 蛋白的方法是利用 LRTM4 蛋白的特异性抗体进行检测, 它包括: 将样品与 LRTM4 蛋白特异性抗体接触; 观察是否形成抗体复合物, 形成了抗体复合物就表示样品中存在 LRTM4 蛋白。

LRTM4 蛋白的多聚核苷酸可用于 LRTM4 蛋白相关疾病的诊断和治疗。在诊断
25 方面, LRTM4 蛋白的多聚核苷酸可用于检测 LRTM4 蛋白的表达与否或在疾病状态下 LRTM4 蛋白的异常表达。如 LRTM4 DNA 序列可用于对活检标本的杂交以判断 LRTM4 蛋白的表达异常。杂交技术包括 Southern 印迹法, Northern 印迹法、原位杂交等。这些技术方法都是公开的成熟技术, 相关的试剂盒都可从商业途径得到。本发明的多核苷酸的一部分或全部可作为探针固定在微阵列(microarray)或
30 DNA 芯片(又称为“基因芯片”)上, 用于分析组织中基因的差异表达分析和基因诊断。用 LRTM4 蛋白特异的引物进行 RNA-聚合酶链反应(RT-PCR)体外扩增也可检测 LRTM4 蛋白的转录产物。

检测 LRTM4 基因的突变也可用于诊断 LRTM4 蛋白相关的疾病。LRTM4 蛋白突

变的形式包括与正常野生型 LRTM4 DNA 序列相比的点突变、易位、缺失、重组和其它任何异常等。可用已有的技术如 Southern 印迹法、DNA 序列分析、PCR 和原位杂交检测突变。另外，突变有可能影响蛋白的表达，因此用 Northern 印迹法、Western 印迹法可间接判断基因有无突变。

5

本发明的优点在于：

1、提供了一个全新的肝再生相关基因 LRTM4。它在再生肝组织中表达升高，并调控细胞生长，是一个与肝再生高度相关、具有促进肝细胞增殖活性的功能基因。

10

2、本发明发现 LRTM4 基因在体内动物模型实验中能促进肝脏损伤的修复，有刺激肝细胞生长的作用，表明 LRTM4 可以作为药物治疗肝脏的急慢性损伤等一系列临床应用，包括肝脏移植后促进肝脏再生、肝癌的基因治疗等应用。

15

3、LRTM4 在多数正常组织中都不表达，但在睾丸和再生肝组织中高表达，表明 LRTM4 有很强的组织表达专一性。睾丸是成人组织中细胞增殖与分化十分旺盛的组织，表明 LRTM4 也与细胞增殖相关，可作为细胞增殖的标志应用于一些与细胞增殖有关的疾病如肿瘤的诊断。

下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件如 Sambrook 等人，分子克隆：实验室手册 (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) 中所述的条件，或按照制造厂商所建议的条件。

20

实施例 1、抑制差减杂交筛选再生肝中高表达基因

25

使用 Trizol 试剂和 MessageMaker reagent assembly 试剂盒 (均为 Gibco BRL 公司产品)，按照说明书中推荐的方法进行组织总 RNA 和 Poly(A)⁺ RNA 抽提，并使用 Clontech 公司试剂盒进行抑制差减杂交。具体方法如下：取 2 μ g mRNA (来自正常肝或再生肝)，加入 1 μ l 浓度为 10 μ mol/L 的寡聚核苷酸 [5'-TTTGTACGCGCCGC(T)15-3'] 为引物，使用 SuperScript II 反转录酶 (Gibco BRL) 合成第一链 cDNA，使用试剂盒内的第二链合成酶合成第二链。合成的双链 cDNA 片段用 RsaI 酶切，然后取出再生肝的 cDNA 片段为受检者 (tester)，分别加入两组接头 1 及接头 2R (接头序列见试剂盒说明)。以正常肝组织来源的 cDNA (不加接头) 作为驱动者 (driver)，再生肝中与正常肝相同的 DNA 序列因杂交形成的双

30

链被减去，再生肝中因差异而剩下的片段经 PCR 选择性扩增后被克隆。所有的液相杂交与 PCR 均在一台 PTC-100 PCR 仪(MJ Research Inc.)上进行。

实施例 2、LRTM4 全长 cDNA 的克隆

5 从差减得到克隆序列中选择一个新的 EST，克隆全长 cDNA。根据数据库 EST 序列进行计算机拼接，设计多聚酶链式反应 (PCR) 引物 P1(5'-GCAACTCGAACATCTTGTC TGT-3'(SEQ ID NO: 4))，P2：(5'-GGCAAATTATGACAGGCTCATA-3'(SEQ ID NO: 5))。采用 TRIZOL 试剂盒(GIBCOL/BRL 公司)，按照说明书中推荐的方法分离大鼠再生肝组织总 RNA。在 20 μ L 逆转录反
10 应体系中，加入 1 μ g 再生肝组织总 RNA，1 μ L 热稳定逆转录酶(Gibco 公司产品)，dNTP，以寡聚(dT)₂₀为引物。50 $^{\circ}$ C 1 小时，85 $^{\circ}$ C 5 分钟，再加入 1 μ L RNase H，37 $^{\circ}$ C 放置 20 分钟切除 RNA。以逆转录反应得到的 cDNA 为模板，PCR 扩增获得 LRTM4 基因 cDNA，PCR 反应条件为 94 $^{\circ}$ C 2 分钟预变性，循环反应为 94 $^{\circ}$ C 30 秒，55 $^{\circ}$ C 30 秒，68 $^{\circ}$ C 90 秒，共进行 35 个循环。PCR 产物(约 1600bp)用低熔点凝胶回收纯化，
15 克隆入 T-载体(Promega 公司产品)中，方法参照《分子克隆. 实验指南》(Sambrook, J., Fritsh, E. F., and Maniais, T., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)。全序列由 TaKaRa 公司(中国，大连)测定。测定的 cDNA 全长为 1576 bp(SEQ ID NO:1)，包含了一个完整的蛋白编码区(SEQ ID NO: 1 中第 335-940 位，不包括终止密码子)，编码了一个由 202 个氨基酸组成的蛋白质(SEQ
20 ID NO: 2)。该蛋白被命名为 LRTM4 蛋白，基因被命名为 LRTM4 基因。

对 LRTM4 蛋白进行的结构分析表明，它是一个四跨膜蛋白，具有四个特征性的疏水跨膜区，从 30 到 47 位氨基酸残基为第一个胞外区，从 109 到 155 位氨基酸残基为第二个胞外区，其中第二个胞外区较长，为 47 氨基酸残基。预测表明 LRTM4 蛋白具有两个糖基化位点，分别是 124 与 156 位的天冬酰胺残基。

25 同源比较发现，LRTM4 与一个已知的人 TM4SF4 基因 (Wice. B.M. etc, JBC, 270(35): 21907-21918, 1995) 有 87%，但是在功能上，人 TM4SF4 蛋白的功能是抑制细胞增殖，而本发明中 LRTM4 基因的功能与之不同，具有促进细胞增殖与细胞损伤修复的功能。另外 LRTM4 蛋白与几个人肿瘤标记蛋白具有同源性：与 L6 肿瘤抗原有 48%同源(Marken J.S. etc, PNAS, 89:3503-3507, 1992)，与 TM4SF5
30 肿瘤抗原由 38%同源 (Muller P.F. etc, 208(1):25-30, 1998)。

实施例 3、点杂交检测 LRTM4 在大鼠肝再生过程中的表达

取大鼠正常肝与部分切除后不同时间点(24, 48, 72 小时)的再生肝，手术

切除后立即放入液氮中保存。采用 TRIZOL 试剂盒(GIBCOL/BRL 公司), 按照说明书推荐的方法制备组织样品总 RNA。

5 将分离制备的正常肝(0)或 24、48、72 小时再生肝的总 RNA, 按照 7.5 单位 DNase I/200 μ g RNA 的量加入 DNase I(Pharmacia Biotech)消化, 除去可能污染的痕量基因组 DNA, 每个样品分别按 5、15、45 μ g RNA 量, 点印到尼龙膜上, 然后 80℃烤 2 小时。将尼龙膜放入杂交管中, 加入 5mL 快速杂交液(Clontech 公司产品), 68℃预杂交 30 分钟, 换 5mL 新鲜杂交液, 加入变性的 32 P 随机标记的 LRTM4 片段的探针(Random Primer DNA 标记试剂盒, TaKaRa 公司), 68℃杂交 1 小时。杂交膜用洗涤缓冲液 I(0.3M NaCl, 0.03M 醋酸钠(PH7.0), 0.05%十二烷基磺酸钠)于室温洗两次, 每次 20 分钟; 然后用洗涤缓冲液 II(15mM NaCl, 1.5mM 醋酸钠(pH7.0), 0.1%十二烷基磺酸钠)于 50℃洗两次, 每次 20 分钟。然后, 压片, -70℃放射自显影。

10 结果如图 1 所示, LRTM4 基因在 24 与 72 小时再生肝中表达明显升高。这表明 LRTM4 在肝脏的再生过程中表达升高。

15

实施例 4、LRTM4 在大鼠组织中的表达分析

取液氮中保存的大鼠 24 小时再生肝、正常肝、睾丸、脾脏、骨骼肌、肺、心脏与脑, 采用 TRIZOL 试剂盒(GIBCOL/BRL 公司), 按照说明书推荐的方法制备组织样品总 RNA。取 10-15 μ g 各组织总 RNA, 在含 2.2 mol/L 甲醛的 1%琼脂糖中电泳分离后, 使用毛细管方法转移到尼龙膜上, 方法参照《分子克隆. 实验指南》(Sambrook, J., Fritsh, E.F., and Maniais, T., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)。

25 将尼龙膜(Multiple Tissue Northern Blot I, Clontech 公司产品)放入杂交管中, 加入 5mL 快速杂交液(Clontech 公司产品), 68℃预杂交 30 分钟, 换 5mL 新鲜杂交液, 加入变性的 32 P 随机标记的 LRTM4 片段的探针(Random Primer DNA 标记试剂盒, TaKaRa 公司), 68℃杂交 1 小时。杂交膜用洗涤缓冲液 I(0.3M NaCl, 0.03M 醋酸钠(PH7.0), 0.05%十二烷基磺酸钠)于室温洗两次, 每次 20 分钟; 然后用洗涤缓冲液 II(15mM NaCl, 1.5mM 醋酸钠(pH7.0), 0.1%十二烷基磺酸钠)于 50℃洗两次, 每次 20 分钟。然后, 压片, -70℃放射自显影。

30 实验结果如图 2 所示, LRTM4 基因在肝脏和睾丸中有表达, 在再生肝中表达明显升高, 表达产物大小约为 1.6 Kb。这说明 LRTM4 基因可能不仅在肝再生过程中起作用, 在睾丸的细胞分裂过程中也可能有一定的作用。

实施例 5、在四氯化碳肝损伤大鼠模型中 LRTM4 基因促进肝脏修复

用植物油溶解四氯化碳(CCl_4),至四氯化碳浓度为 40%(V/V)。按照 0.5 ml /kg 及 1.0ml/kg 体重的量用四氯化碳灌喂大鼠。取 200 μg 含有 LRTM4 基因编码区的 pCDNA3 重组质粒,与 50 μL 脂质体分别溶于 500 μL PBS 后混合,取灌喂 24 小时后的大鼠通过尾静脉将 LRTM4 表达质粒注入大鼠体内。72 小时后,处死大鼠,取出肝组织置入液氮保存;取血液静置后离心取血清。

采用 TRIZOL 试剂盒(GIBCOL/BRL 公司),按照说明书推荐的方法制备组织样品总 RNA。按照实施例 2 的方法进行逆转录制备 cDNA 模板。LRTM4 基因的扩增是使用 LRTM4 编码区引物(CDS1: 5'-CCGCTCGAGCCACCCCAGCATGTGTACT-3'(SEQ ID NO: 6); CDS2: 5'-GCGTCGACT GGTCTATCACCCCCACA-3'(SEQ ID NO: 7)),进行 PCR 扩增,反应条件为 94℃2 分钟预变性,循环反应为 94℃30 秒,55℃30 秒,72℃90 秒,共进行 35 个循环。GAPDH 表达量的测定是使用 GAPDH 基因特异引物(GAPDHL: 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'; GAPDHR: 5'-ACCACAGTCCATGCC ATCAC-3'),进行 PCR 扩增,反应条件为 94℃2 分钟预变性,循环反应为 94℃30 秒,55℃30 秒,72℃90 秒,共进行 25 个循环,反应产物作为内标。LRTM4 与 GAPDH 的扩增产物同时电泳,扫描定量,计算 LRTM4 与 GAPDH 量的比值作为 LRTM4 的表达水平。

使用转氨酶定量试剂盒(Transaminases Quantitative Kit, SIGMA 公司),按照产品说明推荐方法检测血清中 GPT 水平:取 100 微升丙氨酸- α -KG 底物 37℃预热后,加入 20 微升血清,混合后 37℃保温 30 分钟,然后加入 100 微升显色试剂,混合后放置室温 20 分钟,加入 1 毫升 0.4 mol/L NaOH,混匀后放置至少 5 分钟后,以水作为对照,测定 505 nm 光吸收。按照说明绘制标准曲线,在标准曲线得到每个样品中的 GPT 含量。

结果如图 3 所示,不同处理组 1 为正常大鼠,2、3 为灌喂 0.5 毫升四氯化碳/千克体重,4、5 灌喂 1 毫升四氯化碳/千克体重,其中 3、5 均导入 LRTM4 基因。试验表明,正常肝组织中 LRTM4 有低水平的表达,同时 GPT 水平较低;摄入四氯化碳后,GPT 水平和 LRTM4 表达水平均升高,并且摄入量越大,GPT 水平越高,而 LRTM4 表达水平在四氯化碳水平升高时反而降低;导入 LRTM4 基因后,LRTM4 表达水平明显升高,并且伴随 GPT 水平下降。这表明在肝组织损伤后 GPT 水平与 LRTM4 基因的表达水平呈密切的负相关。

综上所述,LRTM4 蛋白为一未见报道的新型肝再生相关蛋白。

实施例6 LRTM4蛋白重组表达和纯化

采用实施例 2 中得到的含有全长 LRTM4 基因的 T 载体纯化质粒作为模板,

使用 LRTM4 蛋白第二胞外区的编码区序列的引物 (EC2f: 5' - CGGGATCCTTTCCATCAACAAGGGTCCT-3' (SEQ ID NO: 8), EC2r: 5' - CGAATTCCGAGATTCCAAGG GACCACAT-3' (SEQ ID NO: 9)), 按照前述方法进行扩增, PCR 反应条件为 94℃2 分钟预变性, 循环反应为 94℃30 秒, 55℃
 5 30 秒, 72℃90 秒, 共进行 20 个循环。PCR 产物经纯化后, 以 Bam HI 与 Eco RI 限制性内切酶处理, 连接到经这两个酶处理的 pGEX-3X 载体上, 并转化 DH5α 感受态细胞。

经鉴定后的转化细胞过夜的饱和培养物, 按照 1:60 的比例接种到 1 升 2×YT 培养基中, 37℃培养 3 小时后, 加入 IPTG 至 0.3 mmol/L, 诱导 3 小时后, 离心
 10 4000rpm, 10 分钟收获菌体, PBS 洗涤一次后, 用含有 1 mmol/L PMSF 的 25 毫升 PBS 悬起菌体, 超声波破碎菌体后, 在溶液中加入 10% Triton X-100 至 1%, 混匀后离心 10000rpm, 10 分钟。离心后的上清上平衡好的谷胱甘肽琼脂糖凝胶柱子, 按照 Pharmacia 公司使用说明, 纯化融合蛋白。

经 10%SDS-PAGE 电泳检测, 在约 31kDa 处有一主条带, 与预测的 GST-LRTM4 融合蛋白的分子量相符。GST-LRTM4 融合蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID
 15 NO: 3 所示, 其中 229-272 位为源自 LRTM4 的片段。

实施例7 抗LRTM4蛋白抗体的产生

取 200 μg 实施例 6 中获得的纯化融合蛋白, 溶于 0.5 毫升去离子水中, 加入
 20 等体积的弗氏完全佐剂并混匀, 多点注射于体重 2.5 Kg 的雄性新西兰大白兔皮内。4 周后使用同样的蛋白量以及弗氏不完全佐剂进行加强注射。过 2 周后进行再次加强。加强后在耳动脉取血, 使用免疫双扩散方法检测抗体效价。当抗体效价达到要求时, 颈动脉放血收集血液并制备抗血清, 加入 NaN₃ 至 0.1%, 置于 -20℃保存。

25

在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考, 就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解, 在阅读了本发明的上述讲授内容之后, 本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改, 这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

序 列 表

(1)一般信息:

(ii)发明名称: 新的肝再生相关蛋白、其编码序列及用途

5 (iii)序列数目: 3

(2)SEQ ID NO: 1的信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 1576bp

10 (B)类型: 核酸

(C)链性: 双链

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: cDNA

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 1:

15 agcaactcga acatcttgtc tgtgctggtg gattattaac agaggttatt ggtctccatg 60
 gcaaaacaat tgaacgatcg cgcagaacgt aatctcattt atgggggtgca aaaaaaaaaa 120
 gacattgggt cagggatata aatgcccatt gccactgagg gcctgctata gttcagaagt 180
 gactccacgg ttcaaaacgc tctgacattt tgggtccaaa tttcttactg aaccaggtac 240
 agccactgca acgcgctgcc aaaacccttg aggagtcttg tgaagctggt ggtgaggagc 300
 20 ctttgatctc tgtgctttac tgtgccaccc cagcatgtgt actgggggct gtgccaggtg 360
 cctggggggc accctcattc ccttggctgt gtttgccgtc ctggcaaata tcctgtttgt 420
 ttttctgga ggaaaagtgg tggatgacaa cagccacctt tcagatgagg tctggtactt 480
 cggaggaata ctgggaagtg gagtcttgat gatcttcct gcgctggtgt tcttgggcct 540
 gcagaacaat gactgctgcg gatgctgtgg taatgagagc tgtgggaagc gatttgcgat 600
 25 gttcacctcc acgttgtttg ctgtggttgg cttcttgggt gctgcatact catttatcgt 660
 ctcagccgtt tccatcaaca agggctcctaa atgcttcatg accaataaca cctgggggata 720
 ccccttccac gatggtgatt atcttaatga ccaagccttg tggagcaagt gcgaagaacc 780
 ccgcgatgtg gtcccttggga atctcaccct tttctccatt ctgctggtca tcggagggat 840
 ccagatggtt ctctgtgcca tccaggtgat caatggcctc ctgggaactc tctgtggaga 900
 30 ctgccagtgc tgtggctgct gtgggggtga tagaccagtc taacaggcta cgatgatctg 960
 ctccaagtct acagcaccat gtgtgggaag acatggccca ggcccagcac tgcacacatg 1020
 ggctgctaac tcctgtccgg ttggatcctc tctggcagag cttgggaggc acaggagatc 1080
 ctttactctc tccaaacaac ttagctcaac ccaggaattt ggtggaattt ttttactttg 1140
 caaattagc cctattttga attccagaac aagtttaaag cacatttttc atgatttccc 1200

ataagaaaag ttaaaataga ggaggtcact tgtcctacca cattgtctct ttgtgtataa 1260
 agatgtccat acttttaggaa tattttgcatt gaactcaaag agataaagca ttacaaggaa 1320
 aaccggtttt tcaggatgca taggtaagga atgattgcta tattatatat aatttttatg 1380
 tgaagcctgt tttggctaac ttgtctggac tacttgtaac tagttttatg agcctgtcat 1440
 5 aatttgccag ggttcccaca tgtatattaa gttaattaaa ttcagaatta aaataataaa 1500
 tgtgggggga ggaagaagag aaagaatgta tcagacctgc ttgtcttttt tctttttata 1560
 aatgcattct ttcttt 1576

(2)SEQ ID NO: 2的信息:

10 (i)序列特征:

(A)长度: 202个氨基酸

(B)类型: 氨基酸

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 多肽

15 (xi)序列描述: SEQ ID NO: 2:

MCTGGCARCL GGTLIPLAVF AVLANILLFF PGKVVDDNS HLSDEVWYFG GILGSGVLM I 60
 FPALVFLGLQ NNDCCGCCGN ESCGKRFAMF TSTLFAVVG F LGAAYSFIVS AVSINKGPKC 120
 FMTNNTWGYP FHDGDYLDNDQ ALWSKCEEP R DVVPWNLT L F SILLVIGGIQ MVLCAIQVIN 180
 GLLGTLCGDC QCCGCCGGDR PV 202

20

(2)SEQ ID NO: 3的信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 276个氨基酸

(B)类型: 氨基酸

(D)拓扑结构: 线性

25

(ii)分子类型: 多肽

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 3:

MSPILGYWKI KGLVQPTRL L LEYLEEKYEE HLYERDEGDK WRNKKFELGL EFPNLPYYID 60
 GDVKLTQSMA IIRYIADKHN MLGGCPKERA EISMLEGAVL DIRYGVSRIA YSKDFETLKV 120
 30 DFLSKLPEML KMFEDRLCHK TYLNGDHVTH PDFMLYDALD VVLYMDPMCL DAFPKLVCFK 180
 KRIEAIQID KYLKSSKYIA WPLQGWQATF GGGDHPPKSD LIEGRGILSI NKGPKCFMTN 240
 NTWGYPFHDG DYLDNDQALWS KCEPRDVVP WNLNSS 276

(2)SEQ ID NO:4 的信息

(i)序列特征

(A)长度: 22碱基

(B)类型: 核酸

(C)链性: 单链

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 寡核苷酸

(xi)序列描述: SEQ ID NO : 4:

GCAACTCGAA CATCTTGTCT GT

22

(2)SEQ ID NO:5 的信息

(i)序列特征

(A)长度: 22碱基

(B)类型: 核酸

(C)链性: 单链

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 寡核苷酸

(xi)序列描述: SEQ ID NO : 5:

GGCAAATTAT GACAGGCTCA TA

22

(2)SEQ ID NO:6 的信息

(i)序列特征

(A)长度: 28碱基

(B)类型: 核酸

(C)链性: 单链

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 寡核苷酸

(xi)序列描述: SEQ ID NO : 6:

CCGCTCGAGC CACCCAGCA TGTGTACT

28

(2)SEQ ID NO:7 的信息

(i)序列特征

(A)长度: 26碱基

(B)类型：核酸

(C)链性：单链

(D)拓扑结构：线性

(ii)分子类型：寡核苷酸

5 (xi)序列描述：SEQ ID NO : 7:

CGGTCGACTG GTCTATCACC CCCACA

26

(2)SEQ ID NO:8 的信息

(i)序列特征

10 (A)长度：28碱基

(B)类型：核酸

(C)链性：单链

(D)拓扑结构：线性

(ii)分子类型：寡核苷酸

15 (xi)序列描述：SEQ ID NO : 8:

CGGGATCCTT TCCATCAACA AGGGTCCT

28

(2)SEQ ID NO:9 的信息

(i)序列特征

20 (A)长度：28碱基

(B)类型：核酸

(C)链性：单链

(D)拓扑结构：线性

(ii)分子类型：寡核苷酸

25 (xi)序列描述：SEQ ID NO : 9:

CGAATTCCGA GATTCCAAGG GACCACAT

28

01.02.05

说明书附图

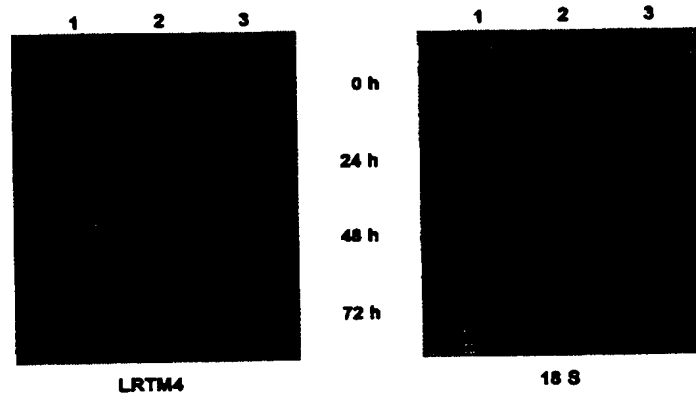


图 1

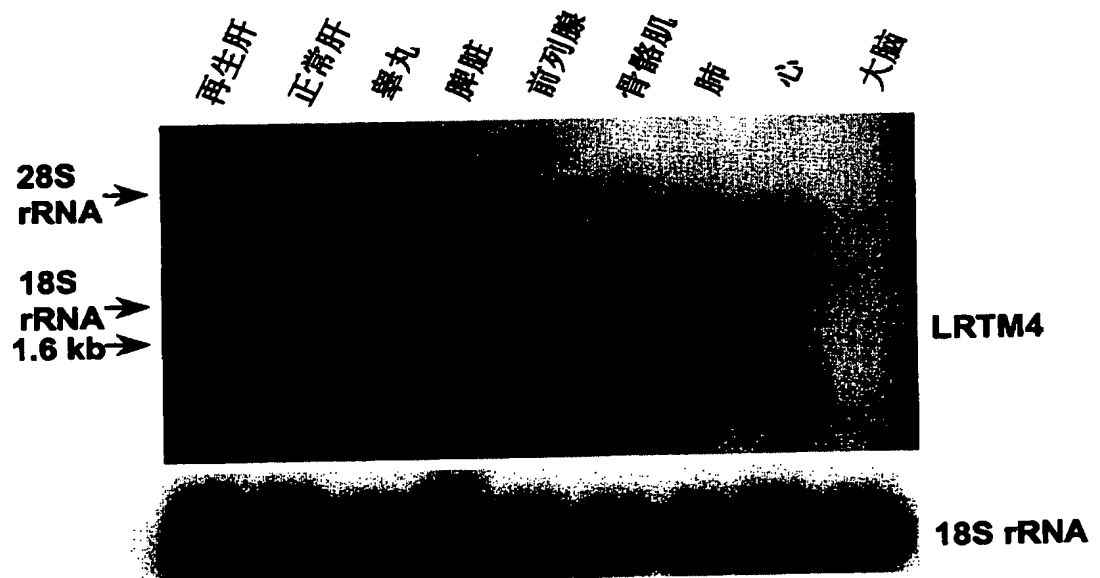


图 2

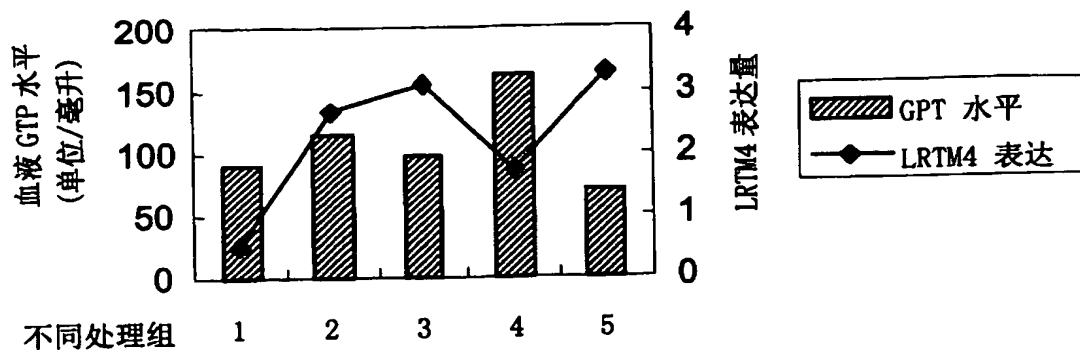
LRTM4 基因对肝脏 CCl₄ 损伤的修复

图 3

```

agcaactcgaacatcttgtctgtgctgggtgattattaacagaggttattgggtctccatg 60
gcaaaacaattgaacgatcgcgcagaacgtaatctcatttatgggggtgcaaaaaaaaaa 120
gacattgggtcagggatataaatgccattgccactgagggcctgctatagttcagaagt 180
gactccacgggttcaaaacgctctgacattttgggtccaaatttcttactgaaccagggtac 240
agccactgcaacgcgtgccaaaaccctgaggagtcctgtgaagctgggtggtagggagc 300
ctttgatctctgtgctttactgtgccacccagcatgtgtactgggggctgtgccagggtg 360
M C T G G C A R C 9
cctgggggggcaccctcattcccttggctgtgtttgccgtcctggcaaatatcctgttgtt 420
L G G T L I P L A V F A V L A N I L L F 29
tttctcaggagaaaagtgggtggatgacaacagccacctttcagatgaggtctgtgactt 480
F P G G K V V D D N S H L S D E V W Y F 49
cggaggaataactgggaagtggagtccttgatgatcttccctgcgctgggtgttcttgggct 540
G G I L G S G V L M I F P A L V F L G L 69
gcagaacaatgactgctgcggatgctgtggtaatgagagctgtgggaagcgatttgcgat 600
Q N N D C C G C C G N E S C G K R F A M 89
gttcacctccacgttgtttgtctgtgttggcttcttgggtgctgcatactcatttatcgt 660
F T S T L F A V V G F L G A A Y S F I V 109
ctcagccgtttccatcaacaagggtcctaatgcttcatgaccaataacacctggggata 720
S A V S I N K G P K C F M T N N T W G Y 129
cccttccacgatgggtgattatcttaatgaccaagccttgtggagcaagtgcgaagaacc 780
P F H D G D Y L N D Q A L W S K C E E P 149
ccgcgatgtgggtcccttgaatctcacccttttctcattctgctgggtcatcggagggat 840
R D V V P W N L T L F S I L L V I G G I 169
ccagatgggttctctgtgccatccaggatgatcaatggcctcctgggaactctctgtggaga 900
Q M V L C A I Q V I N G L L G T L C G D 189
ctgccagtgtgtggctgtgtgtgggggtgatagaccagtctaacaggctacgatgatctg 960
C Q C C G C C G G D R P V 202
ctccaagtctacagcaccatgtgtgggaagacatggcccaggcccagcactgcacacatg 1020
ggctgctaactcctgtccggttggatcctctctggcagagcttgggaggcacaggagatc 1080
ctttactctctccaaacaacttagctcaaccagggaatttgggtggaatttttttactttg 1140
caaattagccctattttgaattccagaacaagtttaaagcacatttttcatgatttccc 1200
ataagaaaagttaaaatagaggaggtcattgtcctaccacattgtctctttgtgtataa 1260
agatgtccatacttttaggaatatttgcattgaactcaaagagataaagcattacaaggaa 1320
aaccggtttttcaggatgcataggttaaggaatgattgctatattatataatattttatg 1380
tgaagcctgttttggctaactgtctggactactgttaactagttttatgagcctgtcat 1440
aatttggcagggttcccatgtatataatgaagtaattaaattcagaattaaaataataaa 1500
tgtggggggagggaagaagagaagaatgtatcagacctgtgtcttttttctttttata 1560
aatgcattctttcttt 1576

```

图 4

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☒ BLACK BORDERS

☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☒ FADED TEXT OR DRAWING

☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☒ SKEWED/SLANTED IMAGES

☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.